

УДК 616.9, 614.446

## Автономный набор для мультиплексного выявления антител к возбудителям инфекционных заболеваний

© 2018 А.Г. ПОЛТАВЧЕНКО<sup>1,\*</sup>, О.В. НЕЧИТАЙЛО<sup>1</sup>, П.В. ФИЛАТОВ<sup>1</sup>, А.В. ЕРШ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р.п. Кольцово, Новосибирская обл. 630559

\*e-mail: poltav@vector.nsc.ru

Поступила 19.06.2018 г.

Принята в печать 29.08.2018 г.

Создан экспериментальный автономный набор, позволяющий одновременно выявлять в препаратах крови антитела к шести возбудителям инфекционных заболеваний: вирусу иммунодефицита человека, вирусам гепатитов В и С, цитомегаловирусу, *Treponema pallidum* и *Toxoplasma gondii*. Набор основан на мультиплексном дот-иммуноанализе на плоских белковых матрицах (иммуночипах) с использованием конъюгатов коллоидного золота и серебряного проявления. Он позволяет выполнять комплексный анализ при комнатной температуре в течение 70 мин и не требует высокой квалификации оператора. В настоящей статье представлены результаты лабораторных испытаний экспериментального образца мультиплексного набора, полученные с использованием массива из 240 клинических образцов. Показано, что мультиплексный тест обладает высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью анализа не менее 95%, а результаты дот-анализа коррелируют с данными, полученными с использованием коммерческих наборов для ИФА, и позволяют проводить полуколичественную оценку содержания специфических антител в образце. При этом мультиплексный дот-анализ более оперативен и экономичен, по сравнению с иммуноферментным анализом, и может выполняться во внелабораторных условиях. Набор может обеспечить комплексный подход к диагностике инфекционных заболеваний, значительно облегчить проведение первичного тестирования, сделать его более оперативным, и доступным для пациентов.

*Ключевые слова:* инфекционные заболевания, диагностика, антитела, мультиплексный дот-иммуноанализ.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-5-57-66

Одним из наиболее быстрых и надежных способов диагностики инфекционных заболеваний является серологическое обследование пациентов с целью выявления антител к отдельным возбудителям [1]. При смешанных инфекциях, когда организм поражается сразу несколькими возбудителями, а также при дифференциации заболеваний, имеющих сходную клиническую картину, часто бывает необходимо выполнение нескольких иммунологических тестов. В настоящее время для такого обследования наиболее широко применяется метод иммуноферментного ана-

лиза (ИФА). Однако обычно применяемые коммерческие наборы для ИФА моноспецифичны т.е. предназначены для выявления антител только к одному патогену, поэтому комплексное обследование требует значительных временных и денежных затрат. Кроме того, не все медицинские учреждения располагают условиями для реализации ИФА, поэтому такие анализы выполняются в основном в диагностических лабораториях, а оперативная доставка образцов в такие лаборатории из отдаленных населенных пунктов часто затруднена.

*Список сокращений:* ВИЧ 1,2 – вирус иммунодефицита человека 1-го и 2-го типов, ВГВ – вирус гепатита В, ВГС – вирус гепатита С, ГТИ – гемотрансмиссивные инфекции, ИФА – иммуноферментный анализ, МДИА – мультиплексный дот-иммуноанализ, ОП – оптическая плотность, ЦМВ – цитомегаловирус; IgG – иммуноглобулины класса G, K<sub>v</sub> – коэффициент вариации.

Мультиплексная иммунодиагностика – новое направление, предполагающее использование так называемых «белковых матриц» (protein arrays), часто называемых «белковыми чипами» или «иммуночипами». Основным достоинством белковых матриц является то, что они позволяют в одном анализе исследовать клинический образец на наличие маркеров к широкому спектру инфекционных заболеваний. Мультиплексные анализы требуют меньше времени, реагентов и объема образца, они более информативны и экономически эффективны, по сравнению с моноспецифичными тестами [2]. Несмотря на очевидные преимущества иммуночипов, технические и эксплуатационные проблемы, препятствуют их реализации в клинических условиях [3]. Большинство проблем при разработке белковых чипов обусловлены огромным разнообразием белков по биохимическим, структурным и конформационным свойствам, а также широким диапазоном концентраций белков в реальных образцах [4–7]. Значительные усилия ученых направлены на решение проблем мультиплексного иммунохимического обнаружения различных наборов клинически значимых аналитов [7, 8], в частности для комплексного выявления маркеров заболеваний, передающихся с кровью – так называемых гемотрансмиссивных инфекций (ГТИ). Обязательному обследованию на эти маркеры в большинстве стран подвергаются широкие контингенты населения, включающие доноров крови и органов, хирургических больных, работников здравоохранения, пациентов учреждений длительного ухода и заключенных в исправительных учреждениях, инъекционных наркоманов, лиц гомосексуальной ориентации и др. [9]. Для охвата диагностикой широких слоев населения может быть особо востребована мультиплексная тест-система, обеспечивающая надежное, оперативное и недорогое тестирование [10, 11]. Известны попытки создания таких систем в различных форматах [10–17]. Однако внедрение многих из приведенных в литературе тестов в клиническую практику остается проблематичным из-за сложности процессов, значительных затрат и необходимости использования специального оборудования [2, 3].

Ранее мы сообщали о разработке метода комплексного выявления антител для оценки поствакцинального иммунитета к детским инфекциям [18] с применением мультиплексного дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах. Эта методология позволяет со-

вместить достоинства мультиплексного анализа с простотой изготовления и применения иммуночипов.

Цель настоящей работы – получить результаты полного цикла лабораторных испытаний экспериментального образца набора для первичного комплексного тестирования препаратов крови на наличие набора антител к вирусам иммунодефицита человека (ВИЧ 1,2), гепатитов В (ВГВ) и С (ВГС), к возбудителям сифилиса (*Treponema pallidum*) и токсоплазмоза (*Toxoplasma gondii*), а также к цитомегаловирусу (ЦМВ). В отличие от прототипа, в экспериментальном образце набора, кроме контроля антител другой специфичности, использовали модифицированные элементы оснастки, изготовленные на специально разработанном автоматическом оборудовании, а при учете результатов – усовершенствованную компьютерную программу. Результаты отдельных этапов лабораторных испытаний были опубликованы ранее [19, 20]. В отличие от предыдущих исследований, настоящая работа выполнена с использованием значительного массива реальных клинических образцов.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Материалы и методы

В работе использовали: азид натрия, казеин, пептон, сахарозу, метол, лимонную кислоту, нитрат серебра и твин-20 (Sigma-Aldrich, США); химические реактивы отечественного производства с квалификацией не ниже «чда».

Использовали следующие иммунореагенты: IgG человека («Имтек», Россия), рекомбинантные антигены: HBcore ВГВ, p150 ЦМВ, мозаичный антиген NC34ab ВГС (ДиаПроФМед, Украина); химерные антигены gp41+gp120+gp36 ВИЧ и *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (Fapon Biotech Inc, Китай); антигены p17 и TmpA *Treponema pallidum*, (*T. pallidum*), («Биосервис», Россия); козы моноклональные антитела к  $\gamma$ -цепи IgG человека (Sigma-Aldrich, США).

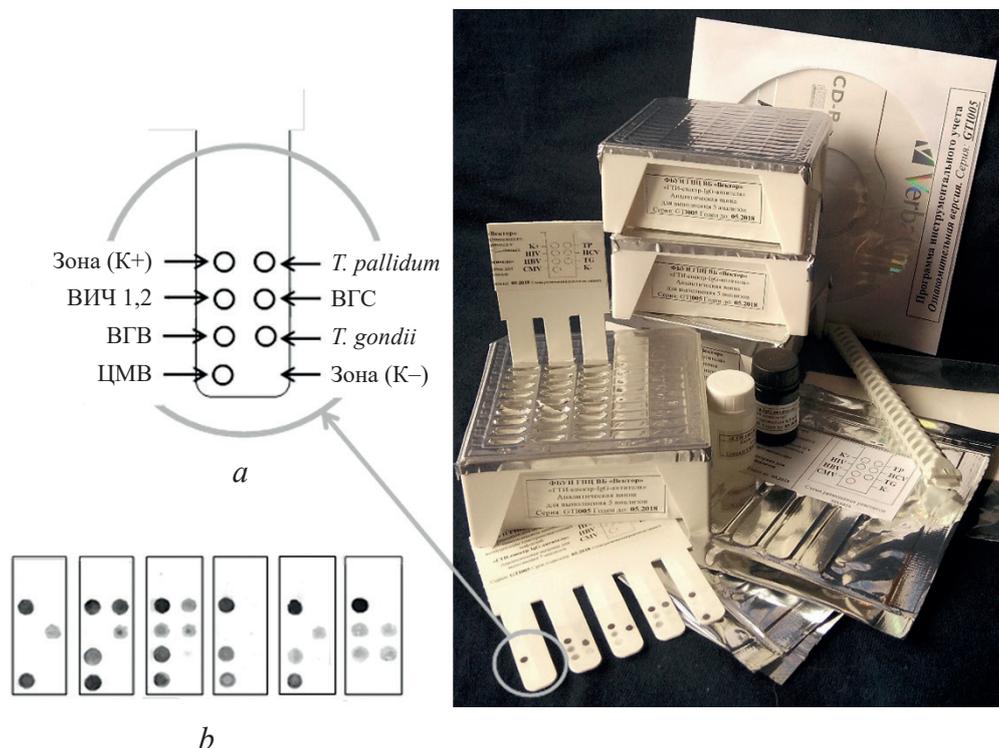
В работе использовали коммерческие контрольные панели сывороток (АО «Медико-биологический союз», Новосибирск); стандартную панель сывороток, содержащих и не содержащих антитела к ВГС («Диагностические системы», Н. Новгород); рабочую панель сывороток «РП АТ(+/-) ГТИ» из 20 образцов, содержащих маркеры инфекций в разных сочетаниях и концентрациях (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск); а также массив в виде слепого набора

образцов из 240 препаратов крови, включающий 200 образцов сывороток от пациентов с инфекционными заболеваниями и 40 образцов плазмы от здоровых доноров (АО «ИмДи», Новосибирск).

В качестве тестов сравнения при оценке показателей мультиплексного анализа использовали наборы для ИФА: ГепаБест анти-НВс-IgG, Бест анти-ВГС, РекомбиБест антипаллидум-IgG, КомбиБест анти-ВИЧ-1+2 («Вектор-Бест», Новосибирск); ИнвитроЛоджик «НВcore-антигела», ВГС-ДСМ, Сиф-IgG-ДС-стрип, ИнвитроЛоджик ВИЧ-1,2-АТ, Мелиса Токсо-IgG, ИнвитроЛоджик ЦМВ-IgG («Медико-биологический союз»); ИФА-анти-НВcore, ИФА-антипаллидум-IgG, ИФА-ВИЧ-1,2-Ат, ИФА-Токсо-IgG («ЭКОлаб», Электрогорск); ДС-ИФА-анти-токсо-G, МилаЛаб-ИФА-анти-НСV, ИФА-анти-ЛЮИС, ДС-ИФА-анти-ЦМВ-G («Диагностические системы»); ЦМВ-, токсо-IgG («ИмДи-спектр», р.п. Кольцово). ИФА выполняли в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Результаты регистрировали на сканирующем спектрофотометре «Multi-scan 310С» (Titertek, Финляндия) при  $\lambda=450$  нм.

Набор для мультиплексного дот-иммуноанализа антител (МДИА) был рассчитан на 20 анализов и включал 4 блока белковых матриц, 4 аналитические ванны, флаконы с бидистиллированной водой и жидким компонентом проявляющей системы (0,4%-ный раствор азотнокислого серебра) и CD-диск с компьютерной программой учета результатов. Общий вид основных элементов набора приведен на рис. 1.

Подложки белковых матриц вырубали с применением типографского прессы из синтетической бумаги «Pentaprint» марки PR-M480/09-07/8101-2D8 (Klöckner Pentaplast, Германия) в виде блоков (гребней) по 5 матриц в блоке, отмывали дистиллированной водой и высушивали. Антигены и иммуноглобулины человека (положительный контроль, K+), разведенные в 0,005 М боратном буферном растворе (рН 8,0) до концентрации 10–20 мкг/мл, с применением уникального автоматического устройства наносили на каждую матрицу аликвотами по 1,5 мкл по схеме, приведенной на рис. 1а. Блоки высушивали в течение 20 ч при 50 °С, блокировали погружением на 1 ч



**Рис. 1.** Основные элементы набора для комплексного первичного тестирования препаратов крови на наличие антител к возбудителям инфекционных заболеваний: а – схема нанесения реагентов захвата на иммуночип; б – примеры результатов мультиплексного дот-иммуноанализа образцов

**Fig. 1.** The basic components of the kit for initial complex testing of blood samples to detect the presence of antibodies to infectious agents: (a), scheme of application of capture reagents on immune chip; (b), examples of results of multiplex dot-immunoassay of samples

в 0,2%-ный раствор казеина на 0,01 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4), тщательно просушили и упаковывали в полиэтиленовые пакеты.

Каждая аналитическая ванна была рассчитана на проведение пяти анализов и включала 12 рядов ячеек по 5 ячеек в каждом ряду. Ванну заполняли рабочими растворами, за исключением ячеек девятого ряда, содержащих по одной таблетке (4 мг) сухого компонента физического проявителя (смесь метола и лимонной кислоты в соотношении 2:5). Рабочие растворы распределяли по рядам с помощью уникального автоматического устройства [21] следующим образом: ряды 2, 3, 5 и 6-й – отмывочный раствор ФСБ-Т (0,02М натрий-фосфатный буферный раствор с 0,8% NaCl, 0,1% твин-20 и 0,1% азида натрия, рН 7,2); ряд 1-й – раствор для разведения образца (ФСБ-Т с 0,02% казеина, рН 8,0); ряд 4-й – рабочее разведение в ФСБ-Т конъюгата (коллоидное золото 20 нм), связанного с моноклональными антителами к IgG человека); ряды 7, 8, 10 и 12-й – бидистиллированная вода; ряд 11-й – стабилизатор окраски (1% тиомочевины в 1%-ном растворе NaOH на дистиллированной воде). Заполненные ванны термически герметизировали комбинированным упаковочным материалом «Colflex» (Al Pak, Словения) на основе алюминиевой фольги. До использования наборы хранили при 4 °С.

Дот-иммуноанализ выполняли при комнатной температуре с объемом рабочих растворов в ячейках 0,3–0,4 мл. Перед анализом вскрывали фольгу перфоратором и вносили в 1-й ряд ячеек ванны по 15 мкл исследуемых препаратов крови, а в 8-й ряд – по 200 мкл бидистиллированной воды (для растворения сухого компонента проявителя). Иммуночипы погружали в первый ряд ячеек и инкубировали 25 мин, а затем последовательно перемещали по рядам со следующими периодами инкубации: ряды 2, 3, 5 и 6-й – по 2 мин; ряды 7, 8, 10, 11 и 12-й – по 1 мин; ряд 5-й – 25 мин и ряд 9-й – 7 мин. Непосредственно перед внесением иммуночипов в ячейки 9-го ряда в них добавляли по 200 мкл жидкого компонента физического проявителя (0,4% нитрата серебра в бидистиллированной воде). После выемки из последней ячейки иммуночипы подсушивали на воздухе и визуально учитывали результаты анализа по наличию или отсутствию темных пятен в местах нанесения соответствующих антигенов (наличие окрашен-

ного пятна свидетельствует о положительном результате). Схема нанесения антигенов на подложку приведена в маркировке на нерабочей части матрицы. После этого изображение иммуночипов оцифровывали с использованием планшетного сканера и анализировали с применением компьютерной программы.

Обработку данных мультиплексного анализа выполняли с применением компьютерной программы<sup>1</sup>, позволяющей автоматически определять интенсивность окраски в каждой зоне нанесения антигена и выразить ее в относительных единицах (процентах диапазона от положительного контроля – IgG человека (K+=100%) до отрицательного контроля – зоны свободной от антигенов (K-=0%)), а также задавать отсекаемые значения (ОП<sub>крит</sub>), предварительно определяемые по панели отрицательных сывороток, и выдавать на печать протокол исследования.

При сравнении массива из 240 сывороток подсчитывали общее число образцов, одинаково квалифицированных более чем половиной референс-тестов, а среди них – количество положительных и отрицательных образцов, определенных каждым тестом. Чувствительность и специфичность по каждому маркеру (X) для каждого теста рассчитывали по общепринятой формуле:

$$X = \frac{N_{\text{прав}}}{N_{\text{общ.к.лф}}} \cdot 100\% ,$$

где  $N_{\text{прав}}$  – число правильно квалифицированных образцов,  $N_{\text{общ.к.лф}}$  – число исследованных образцов данной квалификации.

Чувствительность вычисляли по положительным, а специфичность по отрицательным образцам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описанный в настоящей статье экспериментальный набор является результатом этапа разработки метода комплексного первичного обследования доноров и населения из групп риска на наличие маркеров гемотрансмиссивных инфекций (ГТИ). Согласно рекомендациям ВОЗ [9] скрининг образцов крови доноров и групп населения с повышенным риском заражения проводится на наличие серологических маркеров: антител к ВИЧ 1,2, ВГС и возбудителю сифилиса, а также поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) и

<sup>1</sup>Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Программа для инструментального учета результатов мультиплексного дот-иммуноанализа АРМ «Лаборант-15», № 2016617045, дата регистрации 23.06.2016.

## АВТОНОМНЫЙ НАБОР ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ

раннего антигена ВИЧ (p24 ВИЧ). Созданный экспериментальный набор позволяет выявлять только антитела (одновременное выявление антител и антигенов требует более сложных методических подходов и будет служить целью последующих исследований), поэтому вместо рекомендованного HBsAg в наборе определяется анти-НВс (антитела к ядерному антигену вируса) – маркер гепатита В, обладающий высокой диагностической ценностью для выявления лиц, инфицированных ВГВ. Кроме того, мы сочли целесообразным включить в перечень определяемых маркеров антитела класса IgG к цитомегаловирусу и *T.gondii*. Они позволяют прояснить некоторые общеметодические вопросы по оценке совместимости компонентов и степени мультиплексирования теста, хотя и не несут диагностической нагрузки, поскольку являются анамнестическими и указывают на перенесенную, а не активную инфекцию.

Сравнивались результаты мультиплексного дот-иммуноанализа, с данными, полученными на моноспецифических наборах для ИФА пяти отечественных производителей (не менее трех наборов

по каждому определяемому маркеру). Сравнение проводили на массиве из 240 образцов сывороток (плазмы) крови от пациентов с инфекционными заболеваниями и от здоровых доноров. Результаты, полученные с применением разных наборов для ИФА, существенно различались по величине оптических сигналов, а в ряде случаев и по качественной квалификации образцов, что, вероятно, может быть связано с использованием производителями разных иммунореагентов захвата и детекции, а также технологических приемов изготовления наборов. Следует отметить, что разная трактовка качественных результатов перечисленными наборами установлена при анализе сывороток с низким содержанием определяемых антител. Учитывая выявленные различия, в обработке использовали только образцы, одинаково квалифицированные более чем половиной референс-тестов, среди которых подсчитывали количество положительных и отрицательных сывороток, определяемых каждым тестом, и вычисляли чувствительность и специфичность для каждого набора. Результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

### Результаты сравнительного анализа специфических антител в массиве из 240 образцов сывороток с применением коммерческих наборов для ИФА, а также набора для мультиплексного дот-иммуноанализа (МДИА)

#### Results of a comparative analysis of specific antibodies in set of 240 serum samples using commercial ELISA kits and a kit for multiplex dot-immunoassay (МДИА)

Набор	Число выявленных образцов											
	ВИЧ 1,2		ВГС		ВГВ		<i>T. pallidum</i>		<i>T. gondii</i>		ЦМВ	
	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–
Референс-набор	197	43	148	92	113	127	24	210	84	156	201	39
В-Бест	197	43	148	87	109	121	21	210	–	–	–	–
Чувствительность, %	100		100		96		88		–		–	
Специфичность, %		100		94		95		100		–		–
МБС	197	43	145	89	107	122	24	210	82	153	200	37
Чувствительность, %	100		98		95		100		98		99	
Специфичность, %		100		97		96		100		98		95
ДС	197	43	148	80	–	–	24	209	84	148	196	37
Чувствительность, %	100		100		–		100		100		98	
Специфичность, %		100		86		–		99		95		95
ЭКОлаб	197	43	–	–	111	121	24	205	–	–	–	–
Чувствительность, %	100		–		98		100		–		–	
Специфичность, %		100		–		95		98		–		–
ИмДи	197	43	–	–	–	–	–	–	82	149	188	39
Чувствительность, %	100		–		–		–		98		94	
Специфичность, %		100		–		–		–		95		100

Набор	Число выявленных образцов											
	ВИЧ 1,2		ВГС		ВГВ		<i>T. pallidum</i>		<i>T. gondii</i>		ЦМВ	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
МДИА	197	43	148	90	109	121	24	205	84	150	198	38
Чувствительность, %	100		100		96		100		100		98	
Специфичность, %		100		98		95		98		96		97

*Примечание:* аббревиатуры производителей наборов и наименования наборов приведены в разделе «Материалы и методы». Жирный шрифт – количество образцов, выявленных отдельными тестами, из числа проб, квалифицированных не менее чем 50% референс-наборами. Серой заливкой выделены расчетные данные. «-» – не определяли.

*Note:* Abbreviations of kits manufacturers and kits names are given in the section “Materials and Methods”. Bold type – number of samples revealed by individual tests from the number of samples qualified by at least half of the reference sets is given. Gray pouring the calculated data (calculation method in the section “Materials and Methods”). «-» – no determined.

Данные табл. 1 показывают, что дот-иммуноанализ с использованием экспериментального образца набора обеспечивает чувствительность и специфичность выявления всех маркеров ГТИ не ниже 95 % и не уступает характеристикам коммерческих наборов для ИФА.

Дополнительные исследования чувствительности и специфичности мультиплексного анализа проводили с применением стандартных, контрольных и рабочих панелей сывороток. Характеристики панелей и результаты анализа их образцов набором МДИА приведены в табл. 2.

Таблица 2

**Характеристики панелей сывороток и результаты их определения мультиплексным дот-иммуноанализом**  
**Properties of control sera panels and results of their detection using multiplex dot-immunoassay**

Маркеры	Состав панелей сывороток		Результаты МДИА	
	+	-	+	-
МБС, контроль АТ(+/-)				
ВИЧ-1,2	6	2	5	3
<i>T. pallidum</i>	4	2	4	2
ЦМВ	5	3	5	3
<i>T. gondii</i>	5	3	5	3
ВГС	4	4	4	4
НВсAg	4	4	4	4
DS, стандартная панель (28 обр.)				
Анти-НСV	20	8	19	9
РП, АТ(+/-)ГТИ (20 обр.)				
ВИЧ-1,2	16	4	16	4
ВГС	11	9	11	9
<i>T. pallidum</i>	6	14	6	14
НВсAg	6	14	6	14
<i>T. gondii</i>	10	10	10	10
ЦМВ	18	2	18	2

*Примечание:* МБС, контроль АТ(+/-) – контрольные панели сывороток, ЗАО «Медико-биологический союз»; DS, стандартная панель – стандартная панель-анти-НСV, НПО «Диагностические системы»; РП АТ(+/-)ГТИ – рабочая панель, ГНЦ ВБ «Вектор». «+» и «-» – положительные и отрицательные образцы, соответственно.

*Note:* МБС, контроль АТ(+/-) – control panels of blood serum from “Medical Biological Union”, Ltd.; DS, стандартная панель-анти-НСV – standard panel-anti-НСV from “Diagnostic Systems”, RPS; РП АТ(+/-)ГТИ – working panel from FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”; «+» and «-» – positive and negative samples, respectively.

## АВТОНОМНЫЙ НАБОР ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ

Из табл. 2 видно, что мультиплексный анализ верно определяет все образцы контрольных панелей (ЗАО «Медико-биологический союз»), кроме одного положительного образца в панели «Контроль АТ(+/-) ВИЧ-1,2». Однако известно, что этот образец содержит не антитела, а антиген р24 ВИЧ и по определению не может реагировать в тесте, предназначенном для выявления антител. В стандартной панели «DS-анти-НСV» (НПО «Диагностические системы») дот-анализ не выявляет 1 положительную сыворотку из 20 (чувствительность 95%). В рабочей панели «РП АТ(+/-) ГТИ» (ГНЦ ВБ «Вектор») мультиплексный анализ правильно квалифицирует все образцы (чувствительность и специфичность 100 %). Вид иммуночипов после анализа шести образцов рабочей панели «Контроль АТ(+/-) ВИЧ-1,2» приведен на рис. 1b.

В табл. 3 приведены результаты корреляционного анализа значений оптических сигналов, полученных при выявлении маркеров ГТИ разными тест-системами в массиве из 240 образцов сывороток.

Данные табл. 3 свидетельствуют о том, что оптические сигналы дот-иммуноанализа хорошо

коррелируют с сигналами тест-систем для ИФА и сопоставимы по своим значениям с корреляцией данных между этими ИФА-системами.

Корреляция значений оптических сигналов дот-анализа с результатами полуколичественных тестов для ИФА, позволяет предположить, что мультиплексный дот-анализ также, как ИФА, может использоваться для полуколичественной оценки содержания специфических антител в образце. График, построенный по результатам сравнительного анализа калибровочных образцов из набора ИФА-Токсо-IgG ЗАО «ЭКОлаб» (рис. 2), свидетельствует о том, что показатели чувствительности ИФА и МДИА совпадают и составляют около 10 МЕ/мл.

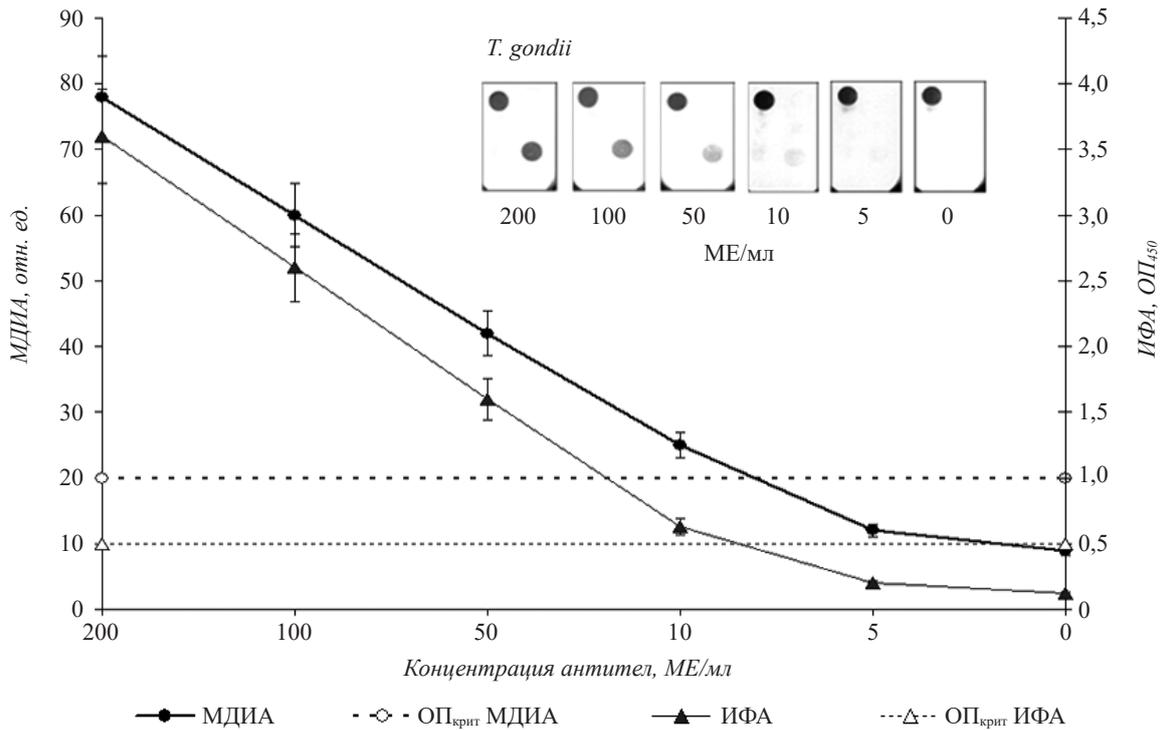
Ряд данных дот-анализа на этом графике в диапазоне чувствительности метода хорошо аппроксимируется прямой, что позволяет проводить ориентировочную количественную оценку содержания специфических антител в исследуемом образце. На изображении иммуночипов, приведенном в верхней части графика, оптические сигналы в диапазоне чувствительности дот-иммуноанализа выглядят как отчетливо различимые

Таблица 3

### Коэффициенты корреляции значений оптических сигналов, полученных при выявлении специфических антител разными тест-системами ( $p = 0,05$ )

Correlation coefficients of optical signals obtained in the detection of specific antibodies by different test systems ( $p = 0.05$ )

Маркер	Антитела к ВИЧ 1,2				Антитела к вирусу гепатита В				
	В-Бест	МБС	ЭкоЛаб	МДИА	В-Бест	МБС	ЭкоЛаб	МДИА	
В-Бест	1	0,84	0,65	0,86	1	0,71	0,78	0,81	
МБС		1	0,90	0,90		1	0,76	0,70	
ЭкоЛаб			1	0,70			1	0,68	
МДИА				1				1	
Маркер	Антитела к <i>T. gondii</i>				Антитела к цитомегаловирусу				
	ИмДи	МБС	ДС	МДИА	ИмДи	МБС	ДС	МДИА	
ИмДи	1	0,96	0,95	0,89	1	0,52	0,50	0,49	
МБС		1	0,97	0,90		1	0,81	0,72	
ДС			1	0,90			1	0,74	
МДИА				1				1	
Маркер	Антитела к вирусу гепатита С				Антитела к <i>T. pallidum</i>				
	В-Бест	МБС	ДС	МДИА	В-Бест	МБС	ДС	ЭкоЛаб	МДИА
В-Бест	1	0,76	0,82	0,81	1	0,82	0,81	0,92	0,72
МБС		1	0,91	0,90		1	0,95	0,91	0,78
ДС			1	0,89			1	0,93	0,79
ЭкоЛаб				–				1	0,78
МДИА				1					1



**Рис. 2.** График зависимости оптических сигналов дот-иммуноанализа (МДИА) и ИФА от концентрации антител к *T. gondii* в исследуемом образце ( $n=3, p=0,05$ ). В верхней части графика приведен вид иммуночипов после проведения дот-анализа, цифрами под иммуночипами обозначена концентрация специфических антител в исследуемых образцах

**Fig. 2.** Dependence of optical signals of dot-immunoanalysis (МДИА) and ELISA (ИФА) on the containing of antibodies to *T. gondii* in the test sample ( $n=3, p=0.05$ ). At the top of the chart is the view of immunochips after the dot-analysis, the numbers under the immunochips indicate the concentration of specific antibodies in the test samples

невооруженным глазом темные пятна в местах нанесения соответствующего антигена. Таким образом, качественный учет результатов анализа таких образцов может легко и надежно осуществляться визуально.

Важной характеристикой диагностических наборов является воспроизводимость результатов определения образцов на разных наборах из одной или нескольких серий. Для оценки воспроизводимости результатов анализа произвольно отбирали по одному блоку матриц и одной аналитической ванне (5 анализов) из трех наборов каждой серии и одновременно выполняли анализ с одним образцом рабочей панели сывороток. Для каждого набора (5 анализов) рассчитывали среднее и доверительный интервал. Для каждой серии (15 анализов) и для трех серий наборов (45 анализов) рассчитывали коэффициент вариации ( $Kv$ ) (табл. 4).

Данные, приведенные в табл. 4, свидетельствуют о хорошей воспроизводимости результатов дот-иммуноанализа как внутри одного набора и серии, так и между разными сериями наборов. Коэффициенты вариации оптических сигналов,

обработанных программой инструментального учета и выраженных в относительных единицах, не превышают 7%.

Исследования стабильности наборов, в том числе с имитацией условий транспортирования и вскрытием первичной упаковки, выполненные в соответствии с ГОСТ РЕН 13640-2010 «Исследование стабильности реагентов для диагностики *in vitro*», не выявили критического ухудшения качества наборов в течение 12 мес. хранения при температуре  $4 \pm 2$  °С.

Результаты исследования свидетельствуют о возможности эффективного использования набора для комплексного первичного тестирования образцов крови на наличие антител к возбудителям инфекционных заболеваний. При этом мультиплексный тест может значительно облегчить и ускорить обследование. Он может служить инструментом как для группового, так и для индивидуального диагностического тестирования. Возможность визуального учета результатов позволяет применять набор без дополнительного оборудования и энергообеспечения, поэтому

**Результаты оценки воспроизводимости оптических сигналов мультиплексного дот-иммуноанализа при определении антител к возбудителям инфекционных заболеваний в образце № 1 рабочей панели сывороток при серийном изготовлении наборов**

**Results for evaluation of repeatability of optical signals when detecting antibodies to infectious agents in sample no.1 of working sera panel for serial kits production**

Набор	Антитела к возбудителям в образце № 1 рабочей панели сывороток, отн. ед. ( $n=5, p=0,05$ )					
	ВИЧ	ВГС	ВГВ	ЦМВ	<i>T.pallidum</i>	<i>T.gondii</i>
Серия 001						
1	96,2 ± 3,1	95,3 ± 4,1	50,5 ± 3,6	84,2 ± 4,8	89,6 ± 5,1	94,2 ± 6,1
2	95,4 ± 3,2	91,7 ± 3,2	47,2 ± 3,5	85,1 ± 4,4	90,5 ± 5,3	86,3 ± 6,2
3	88,4 ± 4,8	92,5 ± 3,6	47,4 ± 3,8	87,2 ± 3,6	97,1 ± 4,9	84,3 ± 5,4
<i>Kv, % (n = 15, p = 0,05)</i>	4,7	2,3	3,5	1,8	4,7	6,0
Серия 002						
1	91,0 ± 6,2	91,3 ± 3,5	56,4 ± 4,5	85,4 ± 4,8	90,4 ± 5,2	90,3 ± 5,2
2	83,2 ± 5,4	89,8 ± 2,4	51,2 ± 2,3	83,1 ± 3,7	91,5 ± 5,6	87,2 ± 5,2
3	95,3 ± 4,9	90,0 ± 2,6	52,4 ± 2,7	90,3 ± 5,1	96,0 ± 7,4	83,6 ± 5,8
<i>Kv, % (n = 15, p = 0,05)</i>	6,8	1,1	4,9	4,2	3,5	4,0
Серия 003						
1	85,3 ± 5,1	84,3 ± 4,5	57,5 ± 3,4	82,3 ± 5,7	88,5 ± 4,6	93,7 ± 5,1
2	82,4 ± 3,7	91,5 ± 4,9	50,2 ± 2,6	85,5 ± 3,3	91,1 ± 5,3	89,7 ± 4,7
3	91,4 ± 6,3	93,0 ± 3,4	50,4 ± 2,2	91,4 ± 3,2	92,0 ± 5,3	87,4 ± 4,3
<i>Kv, % (n = 15, p = 0,05)</i>	5,3	5,3	4,5	5,3	2,3	3,4
<i>Kv, % (n = 45, p = 0,05)</i>	5,9	3,4	6,8	3,5	3,3	4,3

анализ может выполняться при оказании экстренной медицинской помощи, а также в удаленных населенных пунктах, не имеющих оборудованных лабораторий, когда операцию или переливание крови осуществляют по неотложным показаниям, а доставка пациента или образцов крови в оснащенный медицинский пункт затруднено или невозможно. Количественные данные анализа могут быть получены с помощью обычного сканера и компьютера с программой инструментального учета. По себестоимости комплексный тест незначительно превышает одно исследование в ИФА.

Таким образом, набор для мультиплексного дот-иммуноанализа антител к возбудителям инфекционных заболеваний обладает характеристиками воспроизводимости, чувствительности и специфичности, не уступающими коммерческим наборам для ИФА. Он может обеспечить комплексный подход к диагностике инфекционных заболеваний и полуколичественный учет результатов анализа, значительно облегчить проведение первичного тестирования, сделать его более оперативным и доступным для пациентов.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Wong J., Sibani S., Lokko N. N., LaBaer J., Anderson K. S. Rapid detection of antibodies in sera using multiplexed self-assembling bead arrays. *J. Immunol. Meth.*, 2009, 350, 171–182. doi: 10.1016/j.jim.2009.08.013
2. Tighe P.J., Ryder R.R., Todd I., Fairclough L.C. ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin. Appl.* 2015; 9, 406–422. doi: 10.1016/j.jim.2015.12.007
3. Ellington A.A., Kullo I.J., Bailey K.R., Klee G.G. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin. Chem.*, 2010, 56, 186–194. doi: 10.1373/clinchem.2009.127514
4. Gaster R.S., Hall D.A., Wang S.X. Autoassembly protein arrays for analyzing antibody –Cretich M., Damin F., Pirri G., Chiari M. Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions. *Biomolecular Engineering*, 2006, 23, 77–88. doi: 10.1016/j.bioeng.2006.02.001
5. Sauer U., Pultar J., Preininger C. Critical role of the sample matrix in a point-of-care protein chip for sepsis. *J. Immunol. Meth.*, 2012, 378, 44–50. doi: 10.1016/j.jim.2012.02.002
6. Hartmann M., Roeraade J., Stoll D., et al. Protein microarrays for diagnostic assays. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 393, 1407–1416. doi: 10.1007/s00216-008-2379-z

7. Petrik J. Diagnostic applications of microarrays. *Transfus. Med.*, 2006, 16, 233–247. doi: 10.1111/j.1365-3148.2006.00673.x
8. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. WHO, 2010. 85 c. URL: <http://www.transfusion.ru/2012/04-13-1.pdf>
9. Len O., Garzoni C., Lumberras C., Molina I., et al. Recommendations for screening of donor and recipient prior to solid organ transplantation and to minimize transmission of donor-derived infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, 20 (7), 10–18. doi: 10.1111/1469-0691.12557
10. Burgess S. T.G., Kenyon F., O’Looney N., et al. A multiplexed protein microarray for the simultaneous serodiagnosis of human immunodeficiency virus/hepatitis C virus infection and typing of whole blood. *Anal. Biochem.*, 2008, 382, 9–15. doi: 10.1016/j.ab.2008.07.017
11. Lochhead M.J., Todorof K., Delaney M. et al. Rapid multiplexed immunoassay for simultaneous serodiagnosis of HIV-1 and coinfections. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49, 3584–3590. doi: 10.1128/JCM.00970-11
12. Corstjens P.L.A.M., Chen Z., Zuiderwijk M., et al. Rapid assay format for multiplex detection of humoral immune responses to infectious disease pathogens (HIV, HCV, and TB). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007, 1098, 437–445. doi: 10.1196/annals.1384.016
13. Myyrylainen T., Talha S.M., Swaminathan S., et al. Simultaneous detection of human immunodeficiency virus 1 and Hepatitis B virus infections using a dual-label time-resolved fluorometric assay. *J. Nanobiotechnol.*, 2010, 8, 27–32. doi: 10.1186/1477-3155-8-27
14. Xu R., Gan X., Fang Y., et al. A simple, rapid, and sensitive integrated protein microarray for simultaneous detection of multiple antigens and antibodies of five human hepatitis viruses (HBV, HCV, HDV, HEV, and HGV). *Anal. Biochem.*, 2007, 362, 69–75. doi: 10.1016/j.ab.2006.12.008
15. Sibani S., Lokko N. N., LaBaer J., Anderson K. S. Rapid detection of antibodies in sera using multiplexed self-assembling bead arrays. *J. Immunol. Meth.*, 2009, 350, 171–182. doi: 10.1016/j.jim.2009.08.013
16. Talha S. M., Saviranta P., Hattara L. et al. Array-in-well platform-based multiplex assay for the simultaneous detection of anti-HIV- and treponemal-antibodies, and Hepatitis B surface antigen. *J. Immunol. Meth.*, 2016, 429, 21–27. doi: 10.1016/j.jim.2015.12.007
17. Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Пьянков С.А. и др. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям. *Вопр. вирусол.* 2015, 60(1), 45–49.
18. Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., et al. Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents. *J. Virological Methods*, 2016, 236, 231–236. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.08.003
19. Poltavchenko A., Ersh A., Filatov P., et al. A kit for multiplexed detection of antibodies to agents of hemotransmissible infections. *J. Biological Sciences* (on line), 2016, 16, (3), 137–144. doi: 10.3844/ojbsci.2016.137.144
20. Бессмельцев В.П., Горяев Е. П., Ралдугин А. Н. и др. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Устройство для автоматического заполнения аналитических ванн. *Биотехнология.* 2014, (4), 88–96.

## Autonomous Kit for Multiplex Detection of Antibodies to Infectious Diseases Causes

A.G. POLTAVCHENKO<sup>1,\*</sup>, O.V. NECHITAILO<sup>1</sup>, P.V. FILATOV<sup>1</sup>, and A.V. YORSH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 630559, Kol'tsovo, Novosibirskaya Oblast Russia

\*e-mail: [poltav@vector.nsc.ru](mailto:poltav@vector.nsc.ru)

Received June 19, 2018

Accepted August 29, 2018

**Abstract**—An experimental autonomous kit for the simultaneous detection in blood preparations of antibodies to causes of 6 infections – human immunodeficiency virus, hepatitis B and C viruses, cytomegalovirus, *Treponema pallidum* and *Toxoplasma gondii* – has been designed. The kit permits to perform a multiplex dot-immunoanalysis on flat protein matrices (immunoarrays) using colloidal gold conjugates followed by the silver development. It makes possible to carry out a complex analysis at room temperature for 70 min and does not require a highly versed staff. In this work, the results of laboratory trials of the experimental specimen of the multiplex kit using an array of 240 clinical samples are represented. It was shown that the multiplex test is characterized by high reproducibility and sensitivity, and its specificity is no lower than 95%. The dot results are in good correlation with the data of ELISA with commercial kits and permit to semi-quantitatively assess the content of the specific antibodies in a sample. At the same time, the multiplex dot is more rapid and economical than ELISA, and it can be performed in out-of-laboratory conditions. The kit can provide a complex approach to the diagnostics of infectious diseases, significantly facilitate the primary testing and make it more rapid and accessible to patients.

**Key words:** infectious diseases, diagnosis, antibodies, multiplex dot-immunoassay.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-5-57-66